

iGEM

2016

Notebook

NOTEBOOK NO. _____
ISSUED TO _____
ON _____ **20** _____
DEPARTMENT _____
RETURNED _____ **20** _____



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

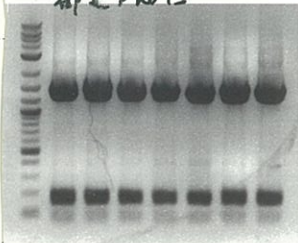
2016.1.18. 所有人

一. 4-10A&B, 1-3DA&B 提质粒 & 酶切验证 →

xyb & zyg. 15:00

二. 敲菌体系 pkb13 胶回收. pkb46 转化.

都是 pkb13



5 μ L		
plasmid 300ng	3	$\times 4$
buf 10x	0.5	2
Pst I	0.1	0.4
EcoRI	0.1	0.4
ddH ₂ O	1.3	5.2
		<hr/>
		2



三. 菌源 8个 gene PCR. 15:00

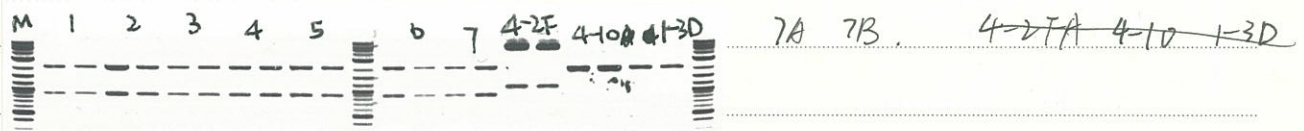
四. 7个 port 酶切验证

4-19F 4-17J 4-19P 4-19N 4-17P 4-17H 4-17N

还剩 4-2F 没做酶切

五. 酶切 1-7A&B 10 μ L 4-2F 10 μ L 15:50

跑胶



2016.1.19

一. 胶回收 xyb & zyg

4-2FA 4-2FB 4-10A 4-10B 1-3DA 1-3DB

啥都没



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

二. PKD46, PKD13, Acp20 转化 xyl6

18:40 30°C 温箱

三. 菌源 8个 gene PCR. 22:00.

PSB18C3 (PCR未加 template.)

挑菌摇过夜

200 μ L \rightarrow 20 mL

摇 $< 3h$

加 0.2% 终浓度 ara 可以多加.

摇 3h 冰上放 20min

收菌不要超过 3mL

水洗 2遍 4000rpm 2min

10% 甘油 洗 2遍 或冰再洗 1遍

剩 100 μ L 悬起 加 fragment 100ng/ μ L, +10 μ L

混匀放电击杯. 1mL

复苏 90min

涂板 10cm.

鉴定正确 转 pcp20 筛 chl 卡出来 PCR

阳性划线到无抗板子



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

2016. 1. 20.

① PKD13 Kana PCR跑胶+回收 一等 ^{PCP20} ~~PKD46~~ 一起电转.

② PKD46 挑菌 ~~明天上午提质粒~~

③ PKD13 扩增 (from chen)

④ PCP20 挑菌 x4, 正在摇 明天上午提质粒.

2016. 1. 21.

① PCP20 提质粒.

② 从 chen lab 带来的 2 包未 label ^(100X) ara 放于 -80°C 冰箱最下层最左边, ara 溶液 ^{2g} 还从 chen lab 拿了部分 L-arabinose 粉末和滤芯, 因为不清楚怎么做液过除菌. 而且将它们放在了常用物品上. -80°C!!!

不能高温灭菌, 会失活.

Future work:

1. PKD46 涂板 + 电转涂板: tonight

2. PKD46 过夜扩增 + 提质粒 } 16.1.22

3. Colony PCR

4. 摸索 E. coli + yeast culture medium,



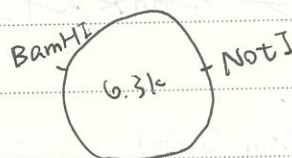
Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

2016.1.22

1. pKD46 电转 pKD13 线性片段. 37°C 温箱 2个kana板
2. pKD46 扩增 2管. 30°C 摇床 (有一个超净台的屋子) (跑胶屋)
3. pKD46 保种 30°C 温箱.
4. pKD46 提质粒 酶切验证 3.7k+2.6k



TOMORROW

5μL

plasmid 4 4 (77.9 μg/μL) mix 8 ✓

BamHI-HF 0.1 0.1

NotI-HF 0.1 -

buf cutsmart 0.5 0.5 0.1.0

ddH₂O 0.3 0.4

label total N⁺ N⁻ 4.8

跑胶 (xyb) 37°C 温箱 21:00 没有条带

5. pKD46 xyb 挑菌 1~5 (跑胶屋子) 盖子上有黑线.

2016.1.23

1. 选3 XYB ②③ pKD46 200μl 轻抽 20ml. XYB pKD46 菌液放于4°C 冷室桌面一个架子上.

2. 加 ara 13:10.

3. xyb pKD46 提质粒 酶切验证

xyb pKD46 酶切

	5μL	x5
plasmid	—	—
BamHI-HF	0.1	0.5
NotI-HF	0.1	0.5
cutsmart	0.5	2.5
ddH ₂ O		



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

5. KOD PCR	pkDN	400	system	30μL	x3
线性片段				1	3
primer	20616EM1-ATPF - KO- F&R			0.75 + 0.75	2.25 + 2.25
dNTPs				3	9
MgSO ₄				2.4	7.2
KOD buf				3	9
KOD				0.6	1.8
ddH ₂ O				19.2	57.6

15:55

94	5'
94	30"
60	30"
68	1'30"
68	7'
12	∞

6. 做348 pKD46电转感受态, 其中1和2来自XYB②. 3和4来自XYB③. 1和4未做电转, 置于-80℃冰箱L-ara袋子中. 2和3转了浓度为250ng/ml的pKD13线性片段. 涂板后在37℃培养基上放着.

7. ✓ PCR结果电泳. 有1391bp片段. 胶回收浓度为125.3ng/ml.



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

2016. 1.24 Sun

+ PKD46 1. LB with xylose

Label = iGEM 2016 20160124 LB X

Problem:

1. 细胞长得慢:

ATPase 敲掉后不能有氧呼吸, 生长慢/存活率不高?

Bacto-tryptone	50g	10g
Yeast extract	5g	1g
NaCl	10g	10g
dH ₂ O	1L	1L
xylose (5g/l)	100g	20g

novozymes
Rethink Tomorrow

2016. 1.25 Mon

1. xyb PKD46 ④⑤⑥各排4管. 30°C 摇床 盖2条红线

349 xyb 20:00

2. PKD46-JXR/XYB 转化

2016. 1.26 Tue

1. xyb 2015.8.16 PKD46 排4管 30°C 摇床

2. 昨天排的 PKD46 有两管比较浓, 离心倒上清放在 4°C holden

3. BC 收拾 4°C 冰箱箱子



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

1.27 Wed.

1. PKD46-XRB-2/3/4/5/6 及 PKD-46-WBH 提质粒, 质粒直接跑胶.

2. PKD46-JXR/XRB 板上已长, 收至 4°C 冷室.

3. 用菌液 PCR 15:00

	20μL	x10		
E.coli	1	10	94	5'
primer	2	—	94	30"
dNTPs	2	20	x25	58 30"
KOD ⁺ buf	2	20	68	1'30"
MgSO ₄	1.6	16	68	7'
KOD ⁺	0.4	4	12	∞
ddH ₂ O	12	120		
		19		

啥都没. 连 5+6 都没杂带. 有引物=新

4. 配胶 1.5% LTY 盒 15:30

55°C 6min ~~15~~ 15' dcas9

1.28

1. 昨日 PKD46 质粒切

plasmid	3		
BamHI-HF	0.1	0.7	✓
SpeI-HF	0.1	0.7	✓
buf cutsmart	0.5	3.5	✓
ddH ₂ O	1.3	9.1	✓

目标条带:

}	4541bp
	2970bp

Sml.

37°C. 1h



Mo Tu We Th Fr Sa Su

Memo No. _____

Date / /

2. 狼兔三窟, 我又PIA管 xyb 14:00

	20μL	x9			
菌液	1	9 ✓		94	5'
primer	1	-		94	30"
dNTPs	2	18 ✓	x10	50	30"
buf	2	18 ✓		68	1'20"
My42a	1.6	14.4 ✓		94	30"
KOD+	0.4	3.6	x20	55	30"
ddH ₂ O	12	108 ✓		68	1'20"
		19		68	7'
				12	∞

3. 晨哥的酶切跑胶. (pK1) 46). by 赵

2. 3. 4. 5. 6 → xyb 的 2. 3. 4. 5. 6 号菌

W → 小武的. (不幸在跑胶中凋亡, 我错了)

4. KOD PCR xyb ly 20:00

8, 12, 18, 22	10, 20	14, 16
55 x 10	59 x 10	57 x 30
50 x 20	51 x 20	

8, 18, 20 有目的条带

回收. 明天酶切连接转化.

1. 29		x35	94	5'
			94	30"
			46	30"
			68	1'30"
			68	7'
			12	∞
1. KOD PCR ly	14:00			
10, 12, 14, 16, 22.	10μL			



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

股图存在电脑上, 10.14.16 有目的条带.

clean-up.

2. screening	System 1	System 2	20μL	x10
菌液	1			14
primer	1			14
dNTPs	2			28
buf	2			28
mgso4	1.6			22.4
KOD ⁺	0.4	0.2		— 28 / 1.4
ddH ₂ O	12	12.2		168 1.4
				<u>18.6</u> 130.2

	94	5'
	94	30"
x1	46	30"
	68	1'30"
	94	30"
x5	58	30"
	68	1'30"
	94	30"
x5	54	30"
	68	1'30"
	94	30"
x22	50	30"
	68	1'30"
	68	7'
	52	∞

1.30 跑胶: 无任何条带



Memo No. _____

Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Date / /

3. pKD46 酶切

1-30

1. pKD46 酶切 run gel 什么都没有!!!

JXR 仅剩最后一点跑了. 没有!!!

2. 昨日梯度 PCR 跑胶. 什么都没有.

3.8

YPD E. coli 感受态.

Yeast —

1. 初始浓度确定?

2. 怎么测混合培养液的每种浓度.

3. 其他合成培养基

Yeast WT

E. coli

抗性

(RFP)

Yeast

E. coli

Control

OD (Y+B)
吸光 (B)

OD (B)

Xyb 1. YPD 5 mL

Yeast 50 ~~50~~ mL

E. coli 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

3-8. 敲菌组

pKD46 基本确定没戏了, 去找笑然师姐要菌

3.9	xyb	YPD - E?Y?	
	E \ Y	0	30
	0	0	1.04
	3	0.09 0.09	1.15
	6	0.19	1.25
	15	0.6	1.37
	30	1.33	1.5
	60	1.69	1.78
	150	1.93	1.93
	300	2.00	?

yeast: BY4741 稀释 20倍后 OD=0.48

E.coli: 红汤 4-17H1 稀释 10倍后 OD=0.44

⇒ 同体积 E & Y, Y OD 约是 E 2倍.

17:00 30°C 接种 盖上面细蓝线.

3.10 1:30 测 OD

约 8h.

E150 Y30 全是 E.coli.

14:00 除了 Y0E0, 其它管已经看不出区别了.

红色看不见! 测吸光?

静置 30min 之后 所有加了 ^{yeast} ~~off~~ 的管子底部都有沉淀.

E0 最少 E30 以上基本一样



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

3.10. 敲菌组

剩下的菌在 -20°C, 检验正确后可放至 -80

15.00 紫然师姐提供的 pKD46 菌 10 μ l + 5ml LB. 摇 2 管

Label: pKD46 IGEM 3.10. ①/② 在 30°C 摇床. 明早 8.00 提质粒.

SCD gradient

OD(19:00)

OD(22:00)

Y0E0	0	0
Y0E5	0.01	0.01
Y0E10	0.02	0.02
Y0E20	0.03	0.04
Y0E40	0.05	0.08
Y5E0	0.04	0.16
Y5E5	0.05	0.18
Y5E10	0.06	0.21
Y5E20	0.07	0.24
Y5E40	0.09	0.28
Y10E0	0.09	0.34
Y10E5	0.10	0.29
Y10E10	0.09	0.32
Y10E20	0.10	0.33
Y10E40	0.11	0.36
Y20E0	0.15	0.56
Y20E5	0.15	0.54
Y20E10	0.17	0.59
Y20E20	0.17	0.58
Y20E40	0.15	0.54
Y40E0	0.23	0.82
Y40E5	0.28	0.87
Y40E10	0.23	0.86
Y40E20	0.23	0.84
Y40E40	0.29	1.00



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

16:00 搬上

30°C 220rpm 5mL SC.

3.11. 8:00 pKD46 提质粒 LY YSC

(sic 洗两遍)

② 真空抽 15 min 30°C

跑胶 5 μ L (Marker 2 μ L) \Rightarrow 浓度 约 30 ng/ μ L

14:00. pKD 46 电转 JXR 菌涂板.

Label. JXR pKD46 iGEM 3-4.



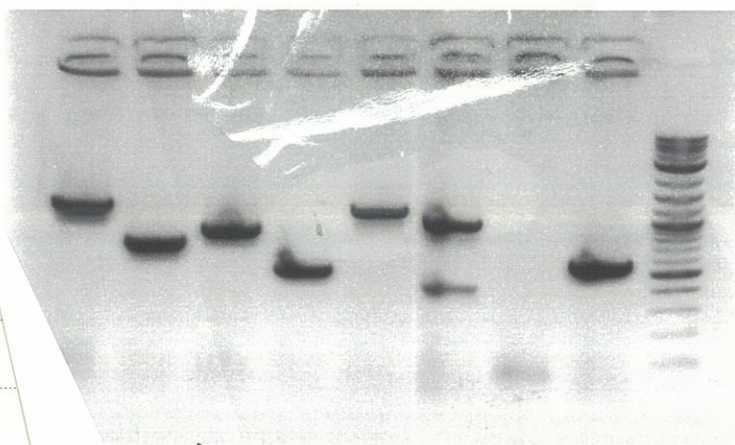
Mo Tu We Th Fr Sa Su

Memo No. _____

Date _____ / _____ / _____

P 1. 管:

菌液	2μL (浓缩15倍)	95°C, 5'	} 35 Cycle
Primer	1 100μL 重悬 (1.5mL 菌液)	95°C, 30"	
dNTPs	2	56°C, 30"	
buffer	2	72°C, 2.5' ^{1#}	
MgSO ₄	1.6	72°C 10min	
KOD ⁺	0.4		
ddH ₂ O	11	16°C +∞	



130P 13PE 13PF 13PG 13PH 13PS 13PV

溶液回收: PCR产物: 15μL

SN: 15 × 5 = 75μL

SB: 15μL

Wash Buffer 洗两次, 各 30S
室温 1min

热水洗 12μL



Mo Tu We Th Fr Sa Su

王人金

Memo No. _____

Date / /

one-pot 连接, 后 + 轻化

轻化过程中 因 ispE 与 ispF 弄混, 后面
注意区分!

ispH 已回收连接, 未轻化,
其第6个轻化已得板, KANA

3.15 阿晨

PKD13 线性片段 PCR. 1391bp. 胶回收 = 128.3ng/μl

PKD46 反场 2μl + 5μl Carb+LB, 30°C (跑胶区中间那个插床, 仅1管), label 16 iGEM 46 / 40:00pm
开始接.

3.16 阿晨

12:15 200μl 菌液连接 20ml LB+Carb

2:55pm 加 L-arabinose

电转复苏. 7:10-8:40 涂板 (kana)

3.16 黄神. 罗明

3:40pm 提 3x6 个质粒, isp(C.D.E.F.G) + idi

送每个的 ~~一号~~ 161 测序.

5:30 pm.



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

PCR (idi, ispG)

Plasmid 1

Primer 0.5 + 0.5

buffer ✓

dNTP 2

Mg²⁺ 1.6KOD⁺ 0.4ddH₂O 12

20 μL

95°C 5'

95°C 30"

58°C 30"

72°C 75"

35x

72°C 10'

16°C ∞

PCR (ispD, ispG)

Plasmid 2.5 ✓

Primer 1.25 + 1.25 ✓

buffer 5 ✓

dNTP 5 ✓

Mg²⁺ 4 ✓KOD⁺ 1 ✓ddH₂O 30 ✓

50 μL

95°C 5'

95°C 30"

55°C 30"

72°C 75"

30x

72°C 10'

16°C ∞

PCR (ispF) Lu Yao

Plasmid 1

Primer 1.5 + 1.5

buffer 5

dNTP 1

Mg²⁺ 4KOD⁺ 1ddH₂O 21 / 50 μL

94°C 2'

94°C 15"

55°C 30"

68°C 45"

35x

68°C 10'

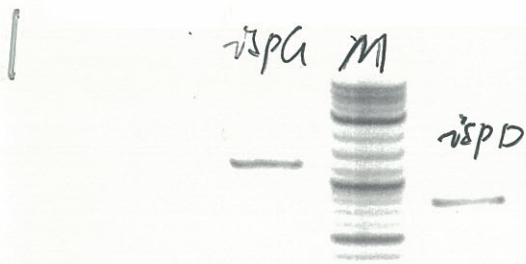
12°C ∞



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /



PCR产物胶回收产物鉴定

2016.3.28

PCR: ispD, ispG

跑胶纯化, 产物置于 ispi ispG gel recovery 袋中.



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

~~ispg~~ispg 12 μ LVector 7 μ LBnf 2 μ LEcoRI 0.5 μ LSpeI 0.5 μ L \rightarrow 2.dd H₂O 5 μ L10 μ LSum 20 μ L~~ispg~~ Rud LwIdi 12 μ LBnf 2 μ LEcoRI 0.5 μ LSpeI 0.5 μ Ldd H₂O 5 μ LSum 20 μ L

TIP头回收

PCR

Idi

ispg

15 μ L15 μ LSN 75 μ LSB 15 μ LSum

Wash Bnf 2次. 30s. 空 1次.

~~for 20°C~~

跑胶, 验证.

左源.



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

2016. 3. 30

hsg RNA (parts vector) miniprep.

共3管, 浓度: 1 2 3
 165.2 160.0 168.4

未酶切验证, 已存 -20°C "2016" 盒子.ispF double digest (~~EcoRI + SpeI~~) (XbaI + PstI)

ispF 7ul

10x Cutsmart 1ul

XbaI 0.2ul

PstI 0.2ul

37°C 2h

ddH₂O 1.6ul / 10ul.

hsg RNA (2620 bp) double digest (SpeI + PstI)

hsg RNA 2ul

10x Cutsmart 1ul

SpeI 0.2ul

PstI 0.2ul

37°C 2h.

ddH₂O 6.6ul / 10ul.

ispF digest 溶液回收已完成, 未验证. 标记为 "ispF*", 存放在 2016, 2017 盒子中.

vector 胶切已完成, 带略奇怪, 未回收. 标记为 "slice". 放在 2016 盒子中.



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

2016. 3.30. Rud

hsg RNA double digestion (EcoRI, SpeI)

✱

vector 4 μ lBuf 2 μ lEcoRI 0.4 μ lSpeI 0.4 μ lddH₂O 13.2 μ lSum 20 μ l

37°C 2h

2016. 4.1 LY

hsg RNA double digest (XbaI + PstI)

✓ hsg RNA 2 μ l✓ 10x cutsmare 1 μ l

✓ XbaI 0.2

✓ PstI 0.2

37°C. 1h

✓ ddH₂O 6.6 / 10 μ l. x5

2016. 4.1 jga

ispD double digest (EcoRI, PstI) Vector digest (EcoRI, PstI).

✓ ispD 3 μ L✓ vector 2 μ L✓ 10x cutsmart 1 μ L✓ 10x cutsmart 1 μ L✓ EcoRI 0.2 μ L✓ EcoRI 0.2 μ L✓ PstI 0.2 μ L✓ PstI 0.2 μ L✓ ddH₂O 5.6 μ L✓ ddH₂O 6.6 μ L10 μ L10 μ L x5

37°C

22:13

18:53

18:36



Memo No. _____

Date / /

Mo Tu We Th Fr Sa Su
3.10

连接:

T4 ligase	1 μ L		25°C	1h
10x Buf	1		55°C	15min
ispG	2	idi 1	80°C	15min
Vector 2		Vector 2	16°C	∞
100x BSA	0.1			
dd H ₂ O	3.9	4.9		
	10 μ L			

ligation, 2016.4.1. LY.

	System 1	System 2	
T4 ligase	1 ✓	1 ✓	
10x Buffer	1 ✓	1 ✓	
ispG*	4 ✓	4 ✓	25°C 2h
(6.5 μ g/ μ L) vector 1	4 ✓	/	45°C 15min
(47.6 μ g/ μ L) vector 2	/	2 ✓	80°C 15min
ddH ₂ O	/	1.9 ✓	16°C ∞
Total	10.1		
BSA	0.1 ✓	0.1 ✓	
Total	10.1	10.	

ligation 4.2 jga.

	sys1	sys2
T4	1 ✓	1 ✓
10x Buff	1 ✓	1 ✓
ispD	4 ✓	4 ✓
vec 1	4 ✓	/
vec 2	/	1 ✓
ddH ₂ O	/	3 ✓
BSA	0.1 ✓	0.1 ✓
	10.1	10.1



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

4.2 jga

酶切感觉不理想, PCR回收产物重新跑胶鉴定. 回收产物条带正确.

重新配制酶切体系:

✓ ispD 4 μ L	✓ vector 10 μ L
✓ 10x cutsmart 1 μ L	✓ 10x cutsmart 5 μ L
✓ EcoRI 0.2 μ L	✓ EcoRI 1 μ L
✓ PstI 0.2 μ L	✓ PstI 1 μ L
✓ ddH ₂ O 4.6 μ L	✓ ddH ₂ O 33 μ L
10 μ L	50 μ L

10:35 am.

37°C 1h

取 10 μ L 做 tip 头回收 ispD 酶切产物回收 12 μ L, 2 μ L 跑胶鉴定. long. μ L⁻¹ 左右浓度ispD PCR 粗产物跑胶鉴定. 50 μ L (45 μ L) 溶液回收.50 μ L vector 回收.

ligation

酶切.

T ₄ ligase	1
10x Buffer	1
ispD	7
vector	1
	10 (μ L)

✓ ispD	35
✓ EcoRI	0.5
✓ PstI	0.5
✓ 10x Buffer	4
	40 (μ L)

室温

37°C

7:56 pm

7:55 pm

用于转化.

ispD 酶切用胶回收.



Memo No. _____

Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Date / /

sys1, sys2, jga3 转化, 涂板.

△ ispD 酶切的胶在 4°C 冷库

△ vec 酶切的胶回收在 20°C 冰箱.

4.4 jga

挑菌 每个培养皿 2 个, 共 6 个. 4mL LB^{amp} 摇.

ispD 和 vector 的酶切, 胶回收产物跑胶鉴定, 都有条带, 但 vec 较暗, 存于 -20°C.

4.5 LY

ispF 2 个连接产物转化, 涂板.

ispF re-PCR.

4.8 jga 测序结果为假阳性 (微笑)

重切 vector

vector 4 μL

lox cutsmart 2 μL

EcoRI (hf) 0.4 μL

Pst I (hf) 0.4 μL

ddH₂O 13.2 μL

total 20 μL 37°C overnight.

4.9 jga

4 μL marker

vector 胶回收, 有条带.

ligation

T₄ ligase 2

lox Buffer 2

ispD 10

vector 6

total 20 μL x2



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

4-12

3月 12日 木



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

4.13.

转16 Q146 (PTG01).

4.15 colony PCR

5 Primer 1.5 + 1.5

2 buffer 5

3 dNTP 5

4 Mg²⁺ 46 KOD⁺ 11 ddH₂O 32

total 50

94°C 2'

94°C 15"

55°C 30"

68°C 45"

68°C 10'

4°C 1h

35x

lig2 colony 1-8.

4.21 2p.

4-20 B10, dCas9, AD PCR

✓ Primer 0.5 + 0.5 2nd 0.3 + 0.3

✓ buffer 2

✓ dNTP 2

✓ Mg²⁺ 1.6✓ KOD⁺ 0.4

✓ template 1st 0.5 2nd 0.2

✓ ddH₂O 12.5

94°C 5' (10'?)

94°C 30"

55°C 30"

68°C 5'/30"

68°C 10'

4°C 1h

35

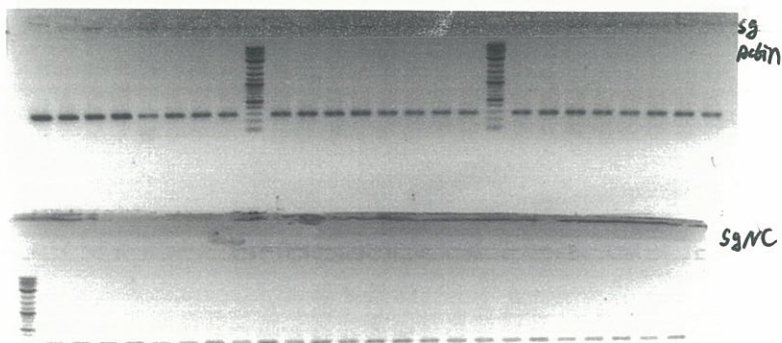


Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

sgRNA - 菌落PCR, 目标 300bp



10 x mix.

primer	0.5X2	5X2	
10x buffer	2	20	✓
dNTP	2	20	✓
Mg ²⁺	1.6	16	✓
KOD	0.4	4	✓
vector ##	0.3	3	
ddH ₂ O	12.7	127	✓

18.7 /



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

vector 0.3 0.6 最右水箱最下, bxb1, hchano

dCas9 1.1 2.2 ✓

BD 0.4 0.8 ✓

AD 0.4 0.8 ✓

BSA 0.1 0.2 ✓

10X Ty Buffer (NEB) 1 2 ✓

Bsr I 0.5 1 ✓

Ty ligase 0.2 0.4 ✓

ddH₂O 6.0 12 ✓

x 2

37°C 60 min
50°C 15 min
80°C 15 min
15°C ∞.

4.22 LY YTK. PCR.

Template (YTK in EET) 300ng 1ul (pKMV YTKO. 2016 VIBN parts kit 查).

Buffer 1.5 94 3'

dNTP 1.5 94 30"

MgSO₄ 1.2 54 30"

Primer 0.5 x 2 72 1'

KOD 0.3 72 7'

ddH₂O 8.5 15

x 29



Memo No. _____

Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Date / /

4.23. LMJ.

引物稀释 100 μ M.

6162

6364

各 4.5 μ l

sgR 1

sgR 2

每管 1 μ l 10x NEB Buffer. \Rightarrow 95°C 10min 关PCR仪.过夜

4.29 LY

Hokm - O- yTK. one pot digestion & ligation

10x T4 buffer 1

100x BSA 0.1

~~Bsa I 0.5~~~~T4 0.2~~

Vector 0.7

yTK ~~1~~ddH₂O ~~7~~

yTK PCR.

yTK-pKANV ① 1

KOD Buffer 1.5

94 3'

dNTP 1.5

94 30"

MgSO₄ 1.2

54 30"

primer 0.5 \times 2

72 1'

KOD 0.3

72 7'

ddH₂O 8.5

15

] $\times 29$



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date _____ / _____ / _____

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09

100 T09



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

5/8 jax

Memo No. _____

Date / /

POT sys :

10 x T₄ buffer 1.0 μ L ✓

100 x BSA 0.1 μ L ✓

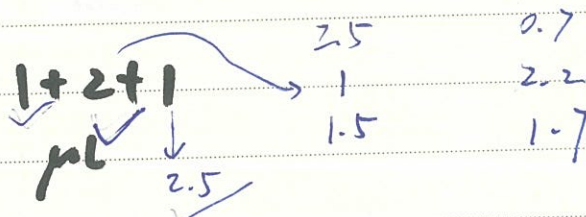
Bsm BI 0.5 μ L ✓

T₄ ligase after 1h 0.2 μ L

POT vector 200ng 1.5 ✓

Parts. (200ng)

P.O.T





Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

RT-PCR

Template: 2.5 μ L

Primer R: 1.5

F: 1.5

buf: 5

dNTP: 5

Mg²⁺: 4KOD⁺: 1ddH₂O: 29.550 μ L

5A112

Media: YPGly + AF

- 10g yeast extract
- 20g peptone
- 5g sulfanilamide
- 50mg hypoxanthine
- 18g agar
- 900 mL ddH₂O

Autoclave

(50°C)

- 5g thymidine
- 200mg methotrexate
- 100 mL 50% (v/v) glycerol, sterilized

2.5 g
100mg
50 mL



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

Media: SC + FUdR:

- 1 L Synthetic Complete agar
- 55 mg FUdR into 1.1 ml ddH₂O (filter S)
add ~~1 ml~~ FUdR.
500 μ l.

Media: SC. agar.

2 x SC - LYS - ADE + agar. (微波)
250 ml 250 ml

Glucose (dextrose 20%) 50 ml

Ade (0.6 mM) 5 ml

LEU (100 μ M) 5 ml



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

5.12

enzyme digestion to check the BD-eGFPdCas9-AID plasmids.

plasmid	2 μ L	✓	label: jga, hym5, hym12.
10x cutsmart	1 μ L	✓	
BsmBI	0.2 μ L	✓	
ddH ₂ O	6.8 μ L	✓	
- total	10 μ L	✓	

12:30 pm : 37°C. (should be cut in 55°C)

5.16

plasmid	10 μ L	✓
10x cutsmart	5 μ L	✓
BsmBI	1 μ L	✓
ddH ₂ O	34 μ L	✓
- total	50 μ L	

55°C 3h.



Memo No. _____

Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Date / /

5.16

TK one-pot 切连 LT.

10x T4 ligase buffer 1

YTK 胶回收 1

37°C 60'

Bsa I 0.5

50°C 15'

T4 ligase 0.2

80°C 15'

Hckan-O. 0.2

15°C ∞.

~~add~~ BSA 0.1ddH₂O 7

5.19

Hc-Kan-O. RT. transformation

dh5a 50 μl

ice 20 min

42°C 90s

LB.

37° recover 30 min.

离心重悬回收

HckanO confirm

Bsm BI 0.2 μl

NEB Buffer 1 μl

plasmid 2 μl.

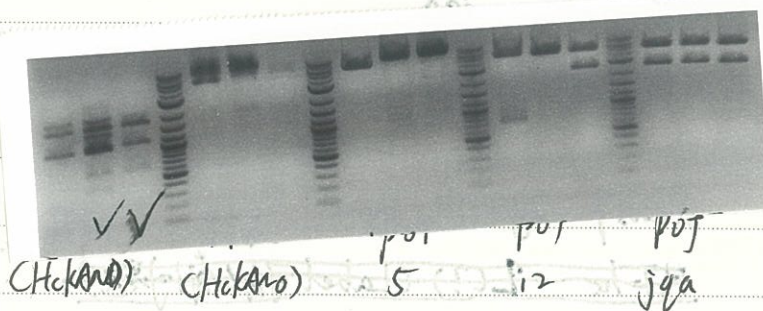
ddH₂O 6.8



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date ____ / ____ / ____



2016. 6. 25

sgRNA 提质粒

挑菌准备

sgRNA 提质粒 + 挑菌准备

!!! 挑菌准备 + 挑菌准备

挑菌准备 + 挑菌准备

挑菌准备



Memo No. _____

Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Date / /

2016.7.1 jqa

已有灰粒(置于-20℃冰箱-1ml序袋)

d(Cas9 hym12, hym5, jqa2

~~RT-hc 2(?) (Label 可能有问题)~~~~RT-hc 1~~~~RT-hc 8~~

YTK-4 517 (有2管)

RT-种子 (有2管)

2016.7.3 jqa

sgRNA, sgNC 在37℃培养箱的板子上(第6板, 各种筛选)

有单克隆的话马上挑起来摇!!!

7.4

sgActin, sgNC 无单克隆

再次涂板.

7.6 J2R

昨日师兄帮忙涂的 sgActin, sgNC 已有单克隆.

~~已有~~ pick x2, 摇,

涂 sgActin x2



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

7.8

苗长了

提质中粒. + sgActin x2 sgNective Control (NCS) x2

7.9.

KOD PCR system

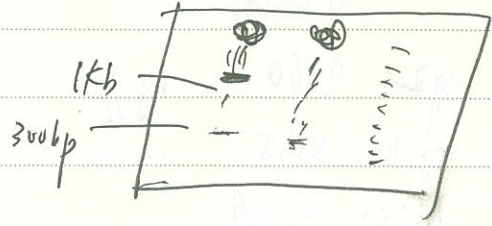
template 1 μ lPrimer R: 1.5 μ lF: 1.5 μ lsgActin1. sgActin2 ., 8 μ l. 85.

Y-Actin-T7.1 Y-Actin-T7-2.

buffer 5 μ l ✓dNTP 5 μ l ✓Mg²⁺ 4 ✓KOD⁺ 1 ✓ddH₂O 31 ✓50 μ l

①. sgActin, Y-Actin linear DNA with T7 promoter & PCR

用KOD system.

sg P 出来图像像一样... MD 是我... \Rightarrow 

②. 体外转录

我已经预见到了这次的失败... 做实验时吹B... 用的老旧的枪头... 桌上的陈年老 ddH₂O... 这要不分解... 02r.



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

7.10

~~nanodrop~~ 测前日体外转录结果

毛都没有。

KOD PCR for linear DNA with T7 promoter -

template 1 μ l.Primer: 15 μ l x 2. { for sg, iGEM84, iGEM85

Y-Actin-T7-1 Y-Actin-T7-2.

buffer: 5 μ l ✓dNTP: 1 μ l ✓Mg²⁺: 4 μ l ✓KOD⁺: 1 ✓ddH₂O: 31 ✓50 μ l

PCR x 15N + 15B

sg2: 9160 ng/ μ l

sg1: 8865

A+A2: 11708

A2: 7847-1

A1: 8860

control: 774



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

0.1V NaOAC

IV 丙酮 - 氯仿 - 异戊醇 25:24:1

Mix (invert 6-8 times)

Transfer to phase lock gel (PLG)

15000rpm, 10min, 4°C

Supernatant + same V 氯仿

Mix

PLG

15000rpm, 10min, 4°C

supernatant is got.

then

↓↓↓

+ 1.5 V 丙酮

1h, -20°C

18000rpm, 15min, 4°C

200μL 75% EtOH Wash

3~5μL 丙酮 溶

① 1V PCI, 静置 3min, 1.2W 10min

② 1V EtOH 洗涤 3min, 1.2W 10min

③ DEPC 水洗 5次 溶解

(200μL 最好预冷)

1: A₁, 2: A₂, 3: A₁ + A₂, 4: sg₁, 5: sg₂, 6: control.~~3min~~

① 20μL + 10μL PCI, 1.5mL tube | 3-5 min, 1.2W ~ 10min

② supernatant: 1V EtOH, 3-5 min | 1.5W 10min

③ ~~DEPC~~ free H₂O (20μL)

④ DNase, 1μL



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /



问题: ① sgRNA lineared DNA 制作时不给力 → 胶回收

② RNA 分解问题 → 用专用通风橱, 枪头

买: 试剂盒, Native page, ~~毒素~~ 毒素 Page

future plan: sgRNA lineared DNA 胶回收, 用 1.2
20 μl 体系体外转录



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

45 μ L PCR 试剂 + 205 SN + 45 SB 回收

回收液

sg1	78
2	82
3	76
4	57

Actin1 34

2	32
---	----

7.18 LY

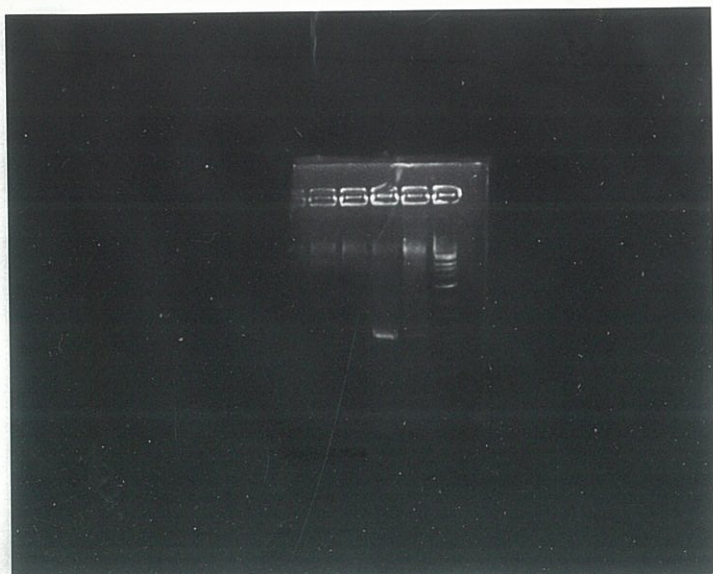
KOD PCR for β Actin & γ Actin linear DNA with T7 promoter.template 1 μ L

primer 1.5 μ L \times 2

{	sg	IGEM 84.85
	γ Actin-T7-1, γ Actin-T7-2	

buffer 5 μ LdATP 5 μ LMg²⁺ 4 μ LKOD+ 1 μ LddH₂O 31 μ L50 μ L

94	3'	} \times 25
94	30"	
- sg 62	30"	
- act 60		
72	- sg 30"	
	- act 1'	
72	7'	
16	∞	



1 2 3 4

1. 2 道 β Actin 未产出. 无杂带.3. 4 道 γ Actin 有目的条带.

大小正确.



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

7.19. LY

1. Sg 1-4 质粒送测序. (m13F).
2. Sg Actin (~~模板 2, 4~~ ³), ~~Actin~~, Actin 老汤 (1) 重 P.
(1, 2, 3, 4)

配方同 7.18. Sg 退火温度降回 60 度.

3. Actin 昨日 PCR 产物胶回收.
与 2. 重 P 产物 (目的条带暗) 一起回收.

回收后 DEPC 水洗脱.

回收后无任何杂带.

4. γ Actin (老汤模板) Sg 1-4 过夜再 P.

Sg 1-4 退火提至 61 度.

配方同 7.18.

7.20 LY

1. 7.19 过夜重 P 后看到条带. 胶回收.
(Sg 目的条带亮度有所增加. Actin 杂带较多, 目的最亮, 但有 smear)

胶回收后, 跑胶 Sg 无杂带, nanodrop 可测到浓度;

Actin 有略大于 1K (1.2K?) 的暗条带.

2. 以胶回收产物为模板, 重 P SgActin. γ -Actin 线性片段.

配方与 7.19 相比, template 5 μ l, ddH₂O 29 μ l.



Mo Tu We Th Fr Sa Su

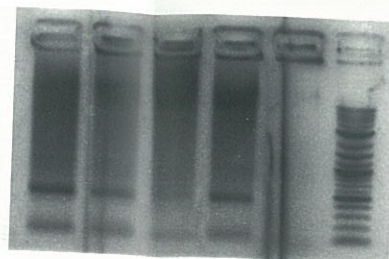
7.21 jga

Run Gel, Confirm PCR products:

sg1~4 placed in

Template & Primer

Memo No.



sg1 sg2 sg3 sg4 Act M.

PCR Actin Again:

Reeiper

✓ template (老汤) 5 μ L

✓ primer 1.5 μ L

1.5 μ L

✓ buffer 5 μ L

✓ dNTP 5 μ L

✓ Mg^{2+} 4 μ L

KOD⁺ 1 μ L

✓ ddH₂O 27 μ L

Program:

94 3'

94 30"

60 30"

72 1'

72 7'

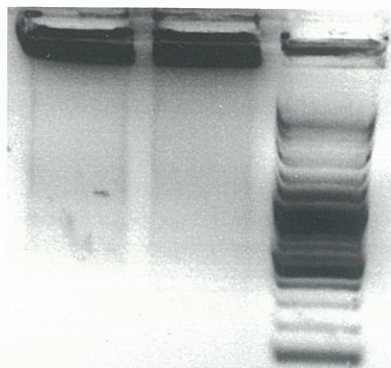
16 ∞

X35

Two copies, labeled as "ACT".

7.22.

It failed.





Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

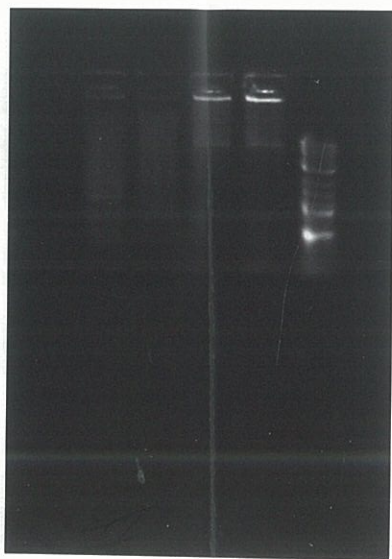
Memo No. _____

Date / /

7.22. [LM]. GCH

1. sgRNA. Actin PCR产物跑胶

Act	Act	sgRNA	
1	2	3	4

 Marker



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

7. 23. jga, gch.

• dCas9 Run Gel:

• Actin Solution Recov,

(Nanodrop measured conc. = $98 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)

Gel:

It does
exist.

Next:

PCR again

using the

PCR product



Mo Tu We Th Fr Sa Su

Memo No. _____

Date / /

Recipe:

Program:

✓ PCR product (as template) 5 μ L
✓ primer 1.5 μ L
1.5 μ L
✓ buffer 5 μ L
✓ dNTP 5 μ L
✓ Mg²⁺ 4 μ L
KOD⁺ 1 μ L
✓ ddH₂O 27 μ L

94°C 3'

94°C 30"

~~62°C~~ 30"

72°C 1' ~~1'~~

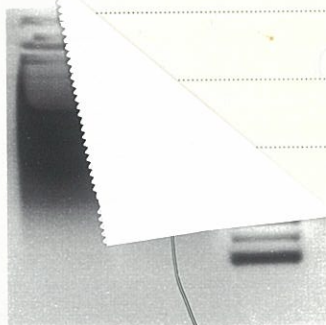
72°C 7'

x35

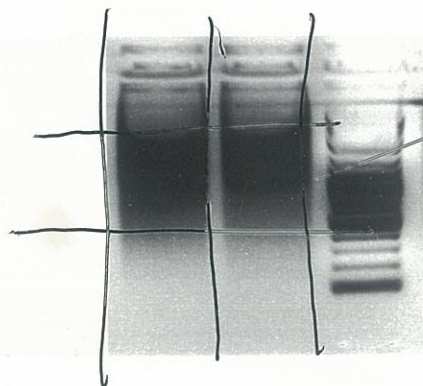
(changes marked as "—").

total 50 μ L

Labeled as "Ace" run in PCR machine (near the new drop)



PCR result, really smeared



did get recovery, got no result.



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

dCas9

深 0.561 mg/mL (A280法)

浅 0.612 mg/mL

① dCas9-BD/AD

SCM

② PAMmer / RT

③ SgRNA

7.27. 9:30 Yeast

1 > dCas9 + RT + SgRNA

2 > dCas9 + PAMmer + SgRNA

~~3 >~~

~
142h?

100g / 5min

7.28

Yeast 营养突变: leu2.

RT. 重新挑菌. 扩大. 摇菌



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

搭橋 PCR

1

2

橋 3

Actin.

10M:

buf: 5M

KOD+: 1M

mg²⁺: 4M

dntp: 5M

31 1: 4M

31-2: 4M

ddH₂O: 27M10 μmol/L
10 mmol/mL

60M

60M

23M

~~8M~~~~8M~~~~19M~~

1.5 2

1.5 2

ddH₂O: 27.

cDNA: 5M. 4

搭橋

①

搭橋

②

搭橋



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

Ura
✓ dCas9 + Sg

Ura, Leu

+ PAMmer

✓ Sg

Leu + ~~GA18~~

dCas9 + Sg
BD AD

✓ ~~GA18~~

YPD

BD dCas9 + Sg

Tips 头回收

5μg SN. 1μg SB. 1μg DNA



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

+ P Actin
+ T₁

12 管 園 P RT : (20 μL)

buf : 2 × 15 = 30

mg²⁺ : 2 × 15 = 30

dNTP : 2 × 15 = 30

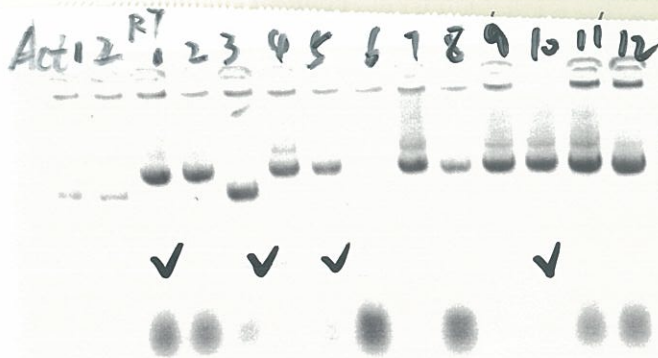
KOD : 0.5

Primer R : 1 × 15 = 15

Primer F : 1 × 15 = 15

H₂O : 11.5 × 15 = 165

Memo No. _____



1. 3. 5. 10 提取粒, 测序

Reaction buf

20mM Tris-HCl pH 7.5

75mM KCl

5mM MgCl₂

1mM DTT (dithio-threitol)

5% glycerol

RT assembly &

(RT). (double)

1× Ty Ligase buffer

1.0 μL

100× BSA

0.1 μL

BsmBI

0.5 μL

Ty Ligase

0.2 μL

Parent ~~RNA~~ P, O, T

, 2,

μL

RT vectors



Mo Tu We Th Fr Sa Su

Memo No. _____

Date ____ / ____ / ____

① 体外转录: 20μL 体系 (8.1)

T₁ 5x buffer: 4μL

ATP + CTP + GTP + UTP: 1.5μL × 4 = 6μL

Enzyme mix (T₁): 2μL

Template: (1-2μg) 1μL, 1μL

Nuclease-free Water: 7μL

② 16:00, 37°C 2-4h

③ 加 DNA 酶, overnight (2h+ 足够)

④ PCI 抽提

乙醇沉淀

乙醇 free water 溶解

⑤ 跑胶验证: 新配 1% 胶, 换 TAE buffer.

8.2

① sgRNA 的 ~~抽提~~ ^{桥P} 抽提

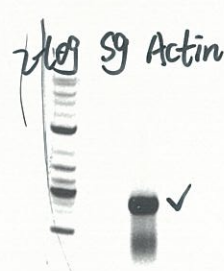
② sgRNA 模板的溶液回收
产物 / actin 模板 → 直接转

③ run gel ^{抽提} _{验证}

④ 体外转录 20μL 体系 (见顶部)

	Act 抽	sg 抽	分溶
Template:	4 μL	4 μL	8 μL
N-F. water	4	4	0

RNA



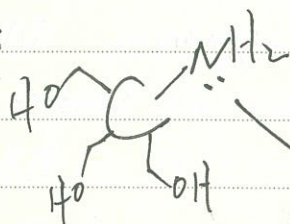


Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

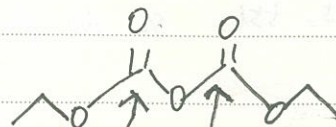
Memo No. _____

Date ____ / ____ / ____

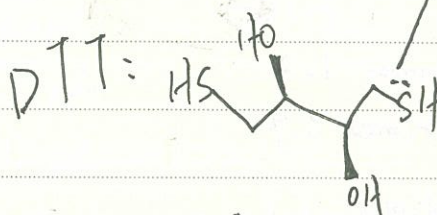
Tris:



DEPC:



DTT:



S.3. Lus MJ

① dCas9 protein - SDS-page : 结果阴性. 蛋白自己分解.

② sgRNA 体外转录的回收

act.



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

2016.8.3 jga.

Memo No. _____

Date / /

POP assembly of RT, yTK

came find 555, 556, so do plasmid preparation again

2016.8.20 jga

C2c2 assembly:

PCR

C2c2 + primer 1,2
 primer 3,4

dCas9 RT + BD primer 1,2
 AD primer 1,2.

Receper

template 5 μ L

primer 2.5 μ L

2.5 μ L

40 μ L / μ L	{	buffer	5 μ L		25	25
		dNTP	5 μ L	1.5	25	25
		Mg ²⁺	4 μ L	1.5	20	20
		KOD+	1 μ L		5	5
		ddH ₂ O	25 μ L		125	125

PCR program

94°C 5'

96°C 30"

55°C 30" 30" for C2, BD, AD

68°C 4' for C1

68°C 10'

16°C ∞



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

2016-8-21. jgg

• BID AD PCR failed.

Use the original plasmids. PCR again

CPJD 13, 14)

Recipe:

template	5 μ l	BID: 13,	AD: 14
primer	2.5 μ l		
	2.5 μ l		
40 μ l	buff.	5 μ l.	15
	dATP	1 μ l.	15
	Mg ²⁺	4 μ l	12
	KOD ⁺	1 μ l	3
	dH ₂ O	25 μ l	75. ✓

~~too μ l mix.~~
~~too μ l mix.~~

Program
94°C 5 min

• Gel Recovery of C1, C2.

60°C 35' X
68°C X 6 min

94°C	30s
55°C	30s
68°C	30s 45s
68°C	10 min
16°C	∞



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

999. One-pot digestion & ligation reaction

to construct dC202-BDAD on HckanD.

Recipe

10x T4 buff. 5 μ L ✓100x BSA 5 μ L ✓Bsa I 2.5 μ L ✓T4 ligase 1 μ LHckanD long (5 μ L) ✓Inserts. 5 μ L
x 4 = 20 μ L ✓ddH₂O. ~~1.5 μ L~~ 1.5 μ L ✓
50 μ L

Program

37°C 60 min

50°C 15 min

80°C 15 min

15°C keep

8.23 } done. f10, f11, label C4 0.00



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

PCR for dCas9 擴載

Primer R: 2 μ L

Primer F: 2

template: 2.5 \checkmark dNTP: 5 \checkmark 10x buf: 5 \checkmark Mg²⁺: 4 \checkmark KOD⁺: 1ddH₂O: 28.5 \checkmark
50 μ L

60退火

26 \times min
7PXlink-His-dCas9. 4 \times .

Vector (PX-H) double digest

Vector 4 μ L10x NEB Buffer 3.1 2 μ LEag I 0.5 μ L

37°C 2h.

Sal I-HF 0.5 μ L

65°C 20'

ddH₂O 13 μ L.20 μ L.



Mo Tu We Th Fr Sa Su

8.25 J9a

Memo No. _____

Date / /

For assembly 构建 HCKamO-C2a2 测序失败, 重构.

怀疑失败是由于 ~~5~~ 片段连接效率太低, 故本次先 ^{100%} 酶切, 再连接

Recipe

~~100~~ 1μl BsaI
1μl overhang
8μl insert

Program

37°C 1h.
55°C 30 min
4°C ∞

连接



Mo Tu We Th Fr Sa Su

Memo No. _____

Date / /

8.27 79a

连接 C1, C2 产物电泳. 结果不理想, 重新酶切
BD, AD

4.7 1 1
3 1 1
5 1 1
5 1 1

产物少, 难以回收, 直接

+1 μ l ligase + 2 μ l buff.

连接 (成对, C1+C2, BD+AD)

20 10
5 10
5 10
5 10

8.27. LMJ.

PCR. + His Tag.

PCR Program

94°C 5min
35x { 94°C 30s
63°C 30s
68°C 6min
68°C 10min
16°C ∞

Mix:

✓ Template : 5 μ l 1x2 μ l
✓ Primer : 2.5 μ l x 2

6 X ✓
buffer 5
dNTP 5
Mg²⁺ 4
KOD⁺ 1
ddH₂O 25

5 x 50 50

20 10
5 10
5 10
5 10

产物跑 gel 验证

金亮马.



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

0828 LMJ

酶切质粒 (空) + Insert

pQLink - smcCas9 - HisTag

Vector/Insert double digest:

1 pQLink	4 μ l	2 Insert	4 μ l	3 10 μ l Insert
10x NEB buf	2	2		
EagI	0.5	0.5		
SalI	0.5	0.5		
dd H ₂ O	13	7		

 Σ

20

Q5	Pfu	Taq	KOD	5652
72 ^o	72	72	68-72	4969 \rightarrow 5000

换酶重新 PCR

KODp	KOD1	KOD2	Taq	Q5	Pfu
+	+	+	+	+	+

Vector

Tip 关回收

1	2	3	4	5	6	7
0	1	2	3	1	2	3



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

8-28 jga

路
张

重P BD.AD, C2C2①, C2C2②
连接产物(2+2)

胶回收

LY Q5 swCas9 - his tag re PCR.
template: hym12.

5x Q5 Buffer	10
10mM dNTP (2.5)	1(4)
Primer	2.5 x 2
hym12	2 / 5
Q5	0.5
ddH ₂ O	28.5 / 25.5

f. 30. LMJ.

↓
条带清晰. 溶液回收.

↓
double digestion - Vector & Insert using Eag I Sal I-HF

10:40 am



Memo No. _____

Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Date / /

10X T₄ ligation buf 2

Insert 10

pGEX⁺ 5T₄ ligase 1ddH₂O 2.↓
转化 ✓↓
培养 ✓



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

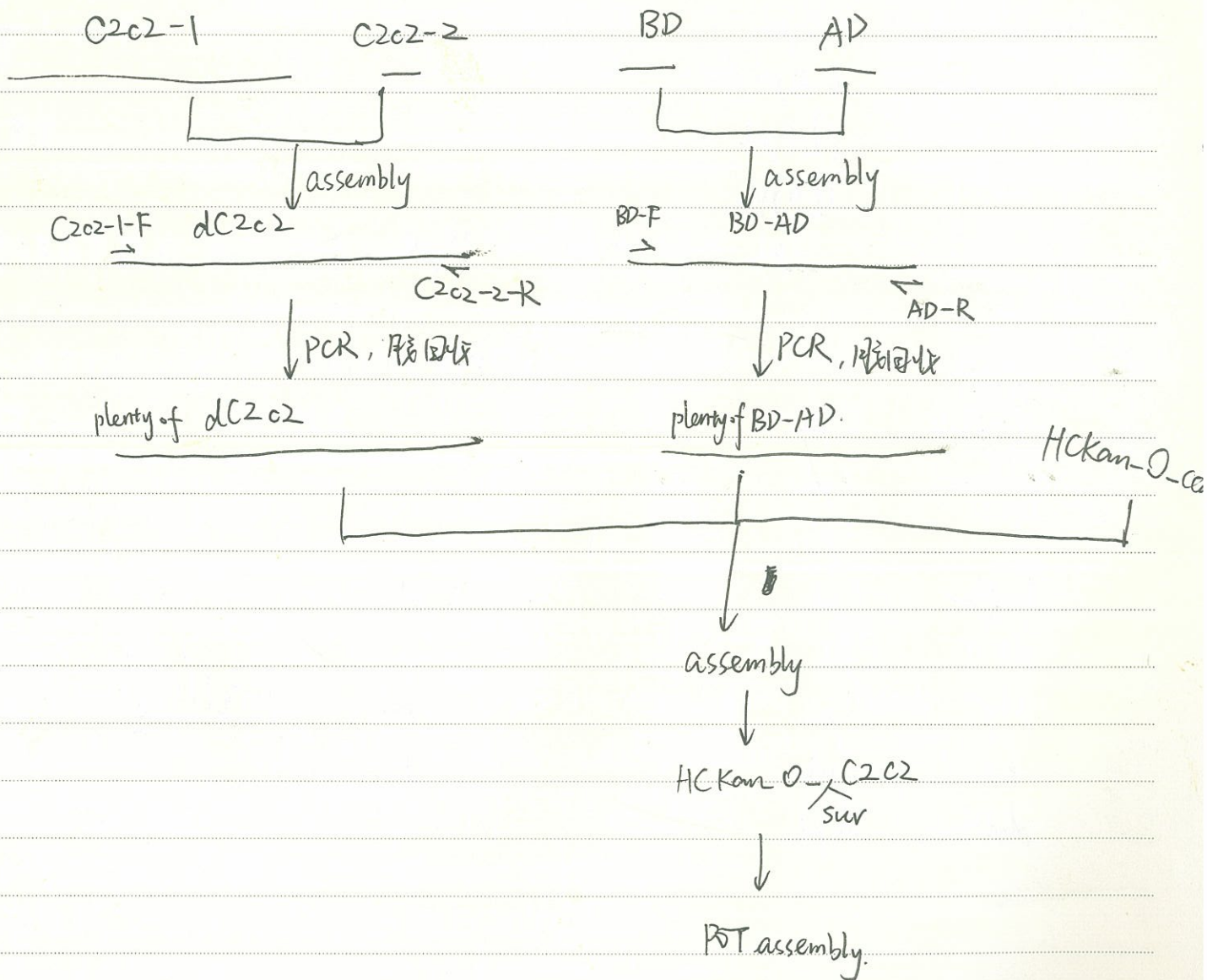
Memo No. _____

Date / /

2016. 8. 30 jga.

C2c2 assembly

宏伟蓝图:

PCR
产物回收



Memo No. _____

Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Date / /

10x Buff.	1 μ L	}	x5 mix.
10x BSA	1 μ L		5 μ L
BsaI	0.5 μ L		5 μ L
T4 ligase	0.5 μ L		2.5 μ L
Insert	2.0 μ L		2.5 μ L
	2.0 μ L		
ddH ₂ O	3 μ L	→	15 μ L.

PCR

(x5)

Template 5 μ LPrimer 2 μ L2 μ L

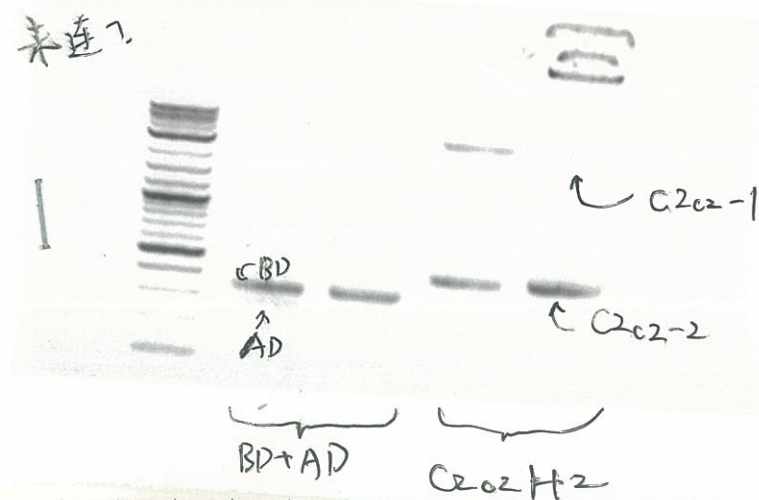
41

buffer 5 μ LdNTP 5 μ LMg²⁺ 4 μ LKOD⁺ 1 μ LddH₂O 26 μ L

{	25 μ L
	25 μ L
	20 μ L
	5 μ L
	130 μ L.

failed

来连?





Memo No. _____

Date / /

Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

8.31. 丁冰

酵母荧光定位观察.

sg⁺: sg⁺ cas⁹ + PAMer. sgsg⁻: cas⁹ + PAMer.

+ 充电

大部分定位于核内, 无明显出核的 GFP 信号.

开机: 从左至右, 总电源 → micro → 1k7.

7x 镜头 micro --- 7x 为空气镜头.

拍摄: live → expo → snap.

合成: Pro → Uti → Add channel.



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

9.2. J2R.

提取质粒.

pGEX-suvCas9. 0.2, 5, 6. - 管没摇起来. 冲穿之.
以提质粒看, 6 最正常.

9.4 LMJ

11 转 pGEX-suv Cas9 plasmid

4:20pm 取出

↓
分装. 100μl/EP tube↓
4:34 加入 10μl ligation product↓
in ice. 30 min↓
42°C. 45s↓
ice 2 min↓
5:32 No 抗 LB. 500μl

37°C. 220.rpm. 45 min

↓
离心到上清.

剩下沉淀板

↓
✓ 100μl



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

9.5. 再次尝试 C2C2. LY.

BD, AD. C1, C2 取回收片段酶切.

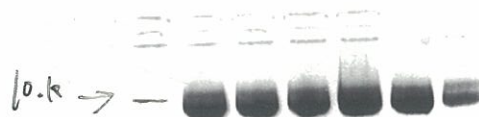
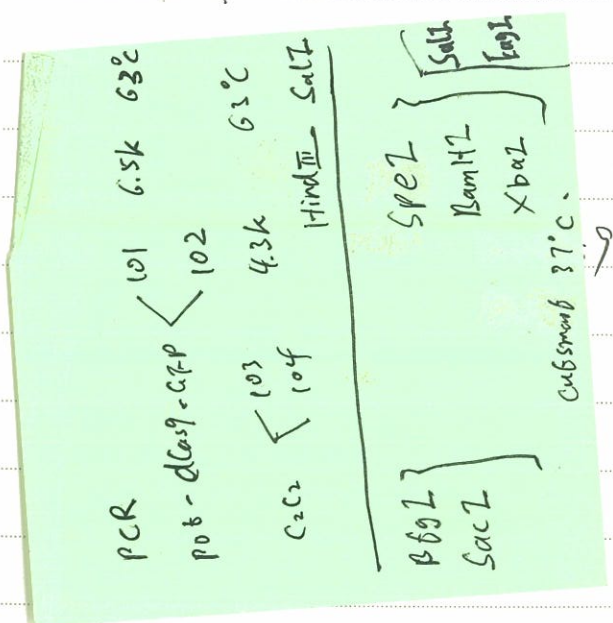
DNA ~~10~~ 4 μ l

Catamant 1 μ l 4 37°C 1h.

BsaI 0.2 μ l 0.8 65°C 20min.

ddH₂O 4.8 ~~4.8~~ μ l 19.2

溶液回收, 连接.



9.6 LY

C1-C2, BD-AD PCR.

Q5 Buffer 10

2.5mM dNTP 4

Primer 2.5 \times 2

Q5 0.5

Ligation product 30.5



Memo No. _____

Date / /

Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

9.7 POT assembly of TK, jga

LY, C2C2 连接产物 (C1-C2, BD-AD) 再 PCR (Q5).
无连接条带.

PGEX-suvCsg HindII 酶切验证.

10 x T4 ligase buff. 1.0 μ L ✓

10 x BSA 1.0 μ L

BsmBI 0.5 μ L ✓

T4 ligase 0.1 μ L (wait).

POT vectors B3 200ng 0.5 μ L ✓

Parts 2.5 μ L 200ng, 400ng, 200ng
ddH₂O 1.5 μ L, 1.5 μ L
up to 10 μ L.

0.8 μ L ✓

Q14 = PRS45-grvA
(Ampr) (~~PRG101~~)
PRG101 (SgrM) backbone
PRS45-grvA
(Q14)

9.18 LY

BL21 转 PGEX-suvCsg 1-6 板已在4度冷库.

接小瓶 (100 / 200 ml) LB, 1:2000 加入抗生素, 37°C 培养 6-8h.

小瓶菌液 30-50 ml 接大瓶.

摇了 18 管, 每板 3 个克隆.



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

~~9.19.~~

9.20. LP

pGEX-sacG⁺ double cut 鉴定 $\left. \begin{array}{l} \text{Pst I} \\ \text{Nhe I} \end{array} \right\} \rightarrow 4.4\text{K} . 6.4\text{K} .$

9.22.

zya . 12-1 . 5-1 . NL 转化 & 涂板

label : 16EM 12-1 / 51 / NL , 9.22.

④ 37°C 培养箱



Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

9.23. J2R.

insert sequence ~~+~~ 溶液回收:

J-1, 12-1. 以 15 μ l 体系回收.

回收后 lable: Insert J-1, Insert 12-1

测活度.

Insert J-1: 3.6 ng/ μ l.

Insert 12-1: 8.7 ng/ μ l?

表达载体酶收: 8.9 ng/ μ l?

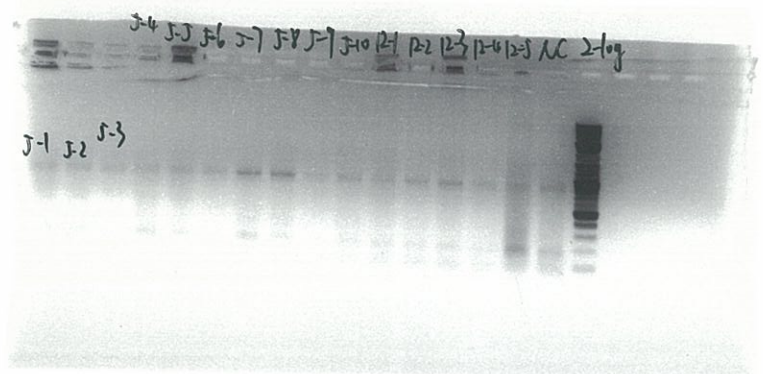
System 1: Insert J-1: 15 μ l. 表: 2 μ l. ligase: 1 μ l. buffer 2 μ l

System 2: Insert 12-1: 12 μ l. \oplus vector: 5 μ l L: 1 μ l B: 2 μ l

9.24.

连接+转化后菌P结果:

无6kb目的条带





Mo	Tu	We	Th	Fr	Sa	Su
----	----	----	----	----	----	----

Memo No. _____

Date / /

10.02 99a

* PEGIX 系列提供耗 置于 2016 parts kit
(4T-1-1~3, 4T)

* TK pot 1-1 为正确.
(ipot 1-1, For MR WBH 中).